

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 660984	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/04063	国際出願日 (日.月.年) 10.09.98	優先日 (日.月.年) 11.09.97
出願人(氏名又は名称) 塩野義製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 3 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし  
☒ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1998年

日本国公開実用新案公報 1971-1995年

日本国登録実用新案公報 1994-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, REGISTRY

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P、7-507210、A (メディノバ エスエフ) 10. 8 月. 1995 (10. 08. 95) & WO93/24531、A	1-8
Y	J P、3-297392、A (塩野義製薬株式会社) 27. 12 月. 1991 (27. 12. 91) (ファミリーなし)	1-8
Y	FEBS LETTERS, 第400巻第2号 (1997) P177-18 2、特にP178 2. 2	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 12. 98.

国際調査報告の発送日

15.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

19 April 1999 (19.04.99)

International application No.

PCT/JP98/04063

Applicant's or agent's file reference

660984

International filing date (day/month/year)

10 September 1998 (10.09.98)

Priority date (day/month/year)

11 September 1997 (11.09.97)

Applicant

ASADA, Hidehisa et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 March 1999 (16.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

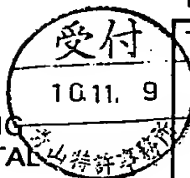
## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)



To:

AOYAMA, Tamotsu  
Aoyama & Partners  
IMP Building  
3-7, Shiromi 1-chome  
Chuo-ku, Osaka-shi  
Osaka 540-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 October 1998 (30.10.98)	
Applicant's or agent's file reference 660984	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP98/04063	International filing date (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 September 1997 (11.09.97)
Applicant SHIONOGI & CO., LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
11 Sept 1997 (11.09.97)	9/246684	JP	30 Octo 1998 (30.10.98)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 22 JUN 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 660984	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/04063	国際出願日 (日.月.年) 10.09.98	優先日 (日.月.年) 11.09.97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>8</sup> G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 塩野義製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.03.99	国際予備審査報告を作成した日 02.06.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加々美一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9408

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1(JP、7-507210、A(メディノバ エスエフ)10.8月.1995(10.08.95))にはBNP(1-76)に対する抗体について、文献2(JP、3-297392、A(塩野義製薬株式会社)27.12月.1991(27.12.91))には $\alpha$ -BNPに対する抗体について、文献3(FEBS LETTERS,第400巻第2号(1997)P177-182、特にP178 2.2)には $\gamma$ -BNP誘導体に対する抗体を使用した哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な免疫測定方法について、それぞれ記載されている。しかしながら、 $\gamma$ -BNP誘導体を測定する際に、 $\alpha$ -BNPに対する抗体とプレプロBNP/ $\gamma$ -BNP誘導体には反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない抗体を組み合わせることで、 $\gamma$ -BNP誘導体を特異的に測定することは、文献1-3に記載されていないし、当業者にとって自明でもない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

RECEIVED

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

AUG 23 2000

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 660984		<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/04063	International filing date (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.1998)	Priority date (day/month/year) 11 September 1997 (11.09.1997)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/53			
Applicant SHIONOGI & CO., LTD.			

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  
These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 March 1999 (16.03.1999)	Date of completion of this report 02 June 1999 (02.06.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No. (81-3) 3581 1101

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/04063

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/04063

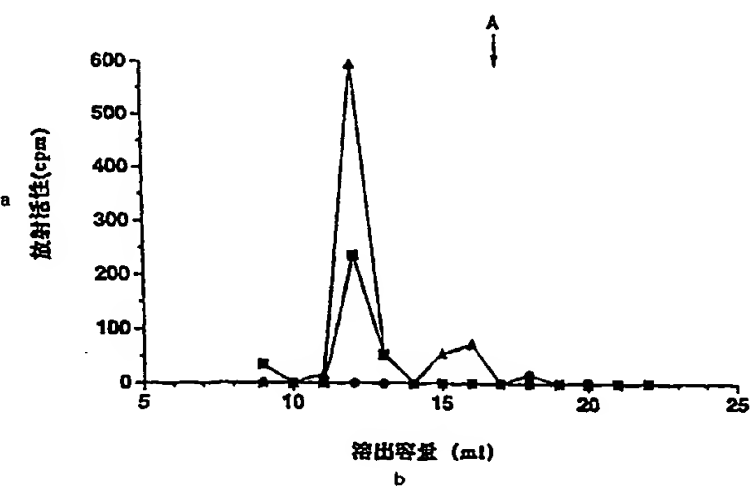
**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1 [JP, 7-507210, A (Medinnova SF), 10 August, 1995 (10.08.95)] describes an antibody against BNP (1-76). Document 2 [JP, 3-297392, A (Shionogi & Co., Ltd.), 27 December, 1991 (27.12.91)] describes an antibody against  $\alpha$ -BNP. Document 3 [FEBS Letters, Vol. 400, No. 2 (1997), p. 177-182, particularly p. 178 2.2] describes an immunoassay method specific for mammalian  $\gamma$ -BNP derivatives, using an antibody against  $\gamma$ -BNP derivatives. However, the specific immunoassay for  $\gamma$ -BNP derivatives by combining an antibody against  $\alpha$ -BNP and an antibody which reacts with preproBNP or  $\gamma$ -BNP derivatives but not with  $\alpha$ -BNP is neither described in any of documents 1-3, nor obvious to a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>G01N 33/53</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/13331</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年3月18日(18.03.99)																										
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/04063  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年9月10日(10.09.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/246684                      1997年9月11日(11.09.97)                      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 浅田英久(ASADA, Hidehisa)(JP/JP) 〒569-1042 大阪府高槻市南平台5-23-5 Osaka, (JP) 清水洋行(SHIMIZU, Hiroyuki)(JP/JP) 〒653-0843 兵庫県神戸市長田区御屋敷通3-1-2 サンタウン御屋敷709号 Hyogo, (JP) 遠藤三朗(ENDO, Kazuaki)(JP/JP) 〒569-1042 大阪府高槻市南平台3-5-18 Osaka, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書																										
<b>(54)Title:    IMMUNOASSAY METHOD FOR BNP</b>  <b>(54)発明の名称</b> BNPの免疫測定法  <b>(57) Abstract</b> An immunoassay method specific for mammalian $\gamma$ -BNP derivatives which comprises using a first antibody reacting with mammalian $\alpha$ -BNP and a second antibody reacting with preproBNP or $\gamma$ -BNP derivatives but not with $\alpha$ -BNP and wherein at least one of these antibodies has been detectably labeled or supported on a solid phase.  <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1;">  <table border="1"> <caption>Chromatogram Data (Estimated)</caption> <thead> <tr> <th>Eluate Volume (ml)</th> <th>Radioactivity (cpm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>5</td><td>0</td></tr> <tr><td>10</td><td>20</td></tr> <tr><td>11</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>580 (Peak 'a')</td></tr> <tr><td>13</td><td>50</td></tr> <tr><td>14</td><td>20</td></tr> <tr><td>15</td><td>50</td></tr> <tr><td>16</td><td>80</td></tr> <tr><td>17</td><td>20</td></tr> <tr><td>18</td><td>10</td></tr> <tr><td>20</td><td>0</td></tr> <tr><td>25</td><td>0</td></tr> </tbody> </table> </div> <div style="flex: 1; text-align: center;"> <p>a...RADIOACTIVITY (cpm) b...ELUATE VOLUME (ml)</p> </div> </div>			Eluate Volume (ml)	Radioactivity (cpm)	5	0	10	20	11	100	12	580 (Peak 'a')	13	50	14	20	15	50	16	80	17	20	18	10	20	0	25	0
Eluate Volume (ml)	Radioactivity (cpm)																											
5	0																											
10	20																											
11	100																											
12	580 (Peak 'a')																											
13	50																											
14	20																											
15	50																											
16	80																											
17	20																											
18	10																											
20	0																											
25	0																											

哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な免疫測定法であって、哺乳類の $\alpha$ -BNPに反応する第1の抗体とプレプロBNPもしくは $\gamma$ -BNP誘導体に反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない第2の抗体とを用い、少なくとも一方が検出可能に標識あるいは固相化されていることがある方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ		
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

## 明 細 書

## BNPの免疫測定法

## 5 技術分野

本発明は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの1つである脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）の免疫測定法に関し、さらに詳しくはγ-BNPおよびその誘導体の免疫測定法に関する。

## 10 背景技術

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには心房性（ANP）、脳性（BNP）およびCタイプ（CNP）ナトリウム利尿ペプチドの3種が含まれており、これらのうち、ANPおよびBNPは主として心臓で生合成され、分泌される心臓ホルモンである。ANPとBNPは構造上類似しており、ANPは28アミノ酸からなる、第7および第23位システイン間のジスルフィド結合により形成されるリング部分を有するペプチドであり、他方BNPは32アミノ酸からなる、第10および第26位システイン間のジスルフィド結合によって形成されるリング部分を有するペプチドである。これら28および32アミノ酸からなる成熟ペプチドは、細胞内で、または細胞からの分泌に際してそれぞれの前駆体からリーダー配列が切り離されて生成すると考えられていた。即ち、ヒトBNPについては、心筋細胞中でプレプロホルモン（以下、プレプロBNPという）として産生され、分泌前または分泌に際してSer26-His27間で開裂され、プロBNP（以下、γ-BNPという）となった後、Arg102-Ser103の間で開裂され、BNP32（以下、α-BNPという）とBNP（1-76）になり、前者が活性を示すと報告されていた。これらの活性発現には、少なくともリング部分が必要であると考えられている。

心臓ホルモンの分泌は様々な心疾患により刺激を受けるため、心機能の変化を良好に反映できる。ANPの分泌は主に心房への負荷で亢進され、BNPは心室

への負荷で生合成、分泌が亢進され、従ってANPおよびBNPは共に心疾患診断の指標として有用である。それぞれの生体内における役割が解明されるにつれ、BNPを心疾患診断の指標とすることの利点が明らかにされてきた。例えば、正常な血中濃度を比較するとBNPはANPの6分の1の濃度にすぎないが、心不全などの場合には、ANPよりも血中濃度が高くなること；心不全の症例では血中BNP濃度がANP濃度とともに上昇するが、重症例ほど血漿BNP濃度はANP濃度を上回ることが多いこと；末梢血レベルでの血漿ANP、BNP濃度はともに心不全の重症度に伴い増加するが、その増加率はANPよりもBNPのほうが大きいことなどである。しかも、心不全症例でのBNP値は健常者の数十倍～数百倍に増加することもあり、心不全におけるBNPの変動は他のホルモンの類を見ないほど顕著であることから、BNP測定の実用性が示唆されている（斎藤能彦ほか、Mebio, 12(5), 28, (1995)）。

このような状況下、心不全の診断に利用できる、BNP抗体を用いる免疫アッセイが開示されている。特表平7-507210はプロテアーゼなどで生体内分解された $\gamma$ -BNP（1-76）を測定する方法を開示しているが、その方法の測定対象である $\gamma$ -BNP（1-76）はBNP活性発現に必要なリング部分などを含んでいないため、BNPのホルモン活性を直接に測定するものでない。

ナトリウム利尿活性を有する $\alpha$ -BNPを測定する手法を提供するものとしてポリクローナル抗体を用いた測定キット（「BNP-32」：ペニンシュラ社製）が市販されている。しかし、この測定では血中にて分解を受けてC末端などが欠損し活性を失った $\alpha$ -BNP分解物をも測定してしまうおそれがある。BNPの血中濃度が低いことを勘案すると、この分解物に対する測定値は無視できないものであり、よって本手法は心不全等を正確に診断するためのBNP測定法としては不都合を内包すると思われる。

一方、上記の不都合のないBNP測定キット（「シオノリアBNP」：塩野義製薬社製）が市販されており、これは活性発現に必要な構造を認識する抗体を用いることを特徴としている。しかし、この測定では $\alpha$ -BNPが採血後、血中で極めて不安定であることから、検体の採血および保存方法などが測定結果に大き



く影響することが危惧される。そのため、本手法において信頼性あるデータを得るために、検体に特別な処理、例えば採血管に分解抑制剤を添加したり、検体を低温に保つなどが推奨されている。このような処理は本件BNP測定キットの広範な臨床応用への障害となるおそれがあった。

5

#### 発明の開示

本発明者らは、BNPが関与する心疾患の正確な診断法を確立するために研究を重ねる過程で、血中でのBNPの形態は、従来考えられていたような $\alpha$ -BNPが主ではなく、 $\gamma$ -BNPおよび少なくとも構造上 $\alpha$ -BNPを含む $\gamma$ -BNP分解物（以下、これらを $\gamma$ -BNP誘導体という）で構成されていることを見出した。また、血中において $\gamma$ -BNPは $\alpha$ -BNPよりも安定であること、即ち、 $\gamma$ -BNPのN-末端構造の役割の1つがBNP分子の安定化であることを見出した。これらのことは、生体が半減期の異なる少なくとも2種類のBNP活性を有するBNP分子を生合成していることを示している。このような知見を得て、本発明者らは、心疾患の正確な診断のためには、 $\alpha$ -BNPのみならず、 $\gamma$ -BNP誘導体を特異的に測定する必要があるとの見解に達し、本発明を完成した。

10

15

20

即ち、本発明は、哺乳類の $\alpha$ -BNPに反応する第1の抗体とプレプロBNPもしくは $\gamma$ -BNP誘導体に反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない第2の抗体とを用いることを特徴とする哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な免疫測定方法を提供するものである。

25

本明細書中、「哺乳類の $\alpha$ -BNP」とは、哺乳類のプレプロBNPまたは $\gamma$ -BNPがそのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端からプロセスされ、N-末端側のペプチドが分離されることにより生成されるナトリウム利尿活性を有する低分子量のペプチドを意味する。 $\alpha$ -BNPは、ヒトの場合、配列表の配列番号1におけるカルボキシ末端側32アミノ酸（第103-134位）からなり、環状構造を有するペプチドである。プレプロBNPのプロセッシングシグナル配列のカルボキシ末端の位置は種により若干異なり、例えばヒトBNPの場合、

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列における第102位のアミノ酸残基Arg、ブタおよびイヌでは第100位のアミノ酸残基に相当する。

「哺乳類の $\gamma$ -BNP」とは、カルボキシ末端に $\alpha$ -BNPに相当する32アミノ酸ペプチド部分を有し、ヒトの場合には、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の27位Hisから134位Hisまでの108アミノ酸からなるプロBNPを意味する。「プレプロBNP」とはヒトの場合、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の1位Metから134位Hisまでの134アミノ酸からなるペプチドを意味する。

「哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体」とは、哺乳類のプレプロBNPまたは $\gamma$ -BNPから、主として生体内のプロテアーゼ作用により生成される、 $\alpha$ -BNPを含み、該 $\alpha$ -BNPよりも大きいペプチド断片を指す。それは、通常、 $\gamma$ -BNPよりも小さいが、それよりも大きい分子であってもよい。本明細書中では、特記しない限り、「 $\gamma$ -BNP誘導体」という場合、 $\gamma$ -BNP自身も該誘導体に含まれる。

本発明において、BNPに関して「安定である」とは、プロテアーゼによる分解を受けるものの、少なくともカルボキシ末端側のリング構造とC末端は残存してナトリウム利尿活性を保持しており、採血後24時間経過してもそのナトリウム利尿活性に有意な減少が見られない状態であることを意味する。この定義に照らして、本発明の測定対象である $\gamma$ -BNP誘導体は安定である。

一方、不安定であるとは、プロテアーゼなどによりC末端が分解を受け、採血後24時間経過すればナトリウム利尿活性に有意な減少が見られる状態を意味し、この定義に照らして、 $\alpha$ -BNPは不安定である。

#### 図面の簡単な説明

図1：  $\alpha$ -BNP測定系で測定した、血漿検体のSuperdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。図中、Aは $\alpha$ -BNPの溶出位置を示す。

図2：  $\alpha$ -BNP測定系で測定した、図1と異なる血漿検体のSuperdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。図中、Aは $\alpha$ -BNPの溶出位

置を示す。

図3：  $\gamma$ -BNP特異的免疫測定法で測定した、図2と同じ血漿検体のSuperdex 75によるゲルろ過HPLCでのクロマトグラム。図中、Aは $\alpha$ -BNPの溶出位置を示す。

5 図4：  $\gamma$ -BNPをヒト血漿中、25℃で保存したときの保存時間と、BNPの免疫活性との関係を示すグラフ。

図5：  $\alpha$ -BNPをヒト血漿中、4℃で保存した時の保存時間と、 $\alpha$ -BNPの免疫活性との関係を示すグラフ。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明は第1の態様として、哺乳類の $\alpha$ -BNPに反応する第1の抗体とプレプロBNPもしくは $\gamma$ -BNP誘導体に反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない第2の抗体とを用いる方法に関する。

15 この方法に使用する抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれでもよく、第1の抗体としては市販されている、または当業者に既知の方法により化学的に合成したヒト $\alpha$ -BNPもしくはその部分ペプチドを免疫原として当業者既知の方法で製造することができる。或いは、市販の $\alpha$ -BNP測定キット「シオノリアBNP」（塩野義製薬社製）に用いられている $\alpha$ -BNPカルボキシ末端部分に反応するモノクローナル抗体を用いることもできる。

20 第2の抗体としては、上記の条件を満たす任意の抗体を用いることができるが、例えば配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号27-102で示されるアミノ酸配列およびその代謝物に特異的な抗体であることが好ましい。本発明の測定対象である $\gamma$ -BNP誘導体は、ヒトの場合、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号27-134で示される部分アミノ酸配列を包含することが好ましい。よって、好ましい態様では、本発明方法に  
25 使用される第2の抗体製造に際し、配列番号1のアミノ酸番号27-102を認識する抗体が作製できるよう抗原を選定する等の注意が必要であろう。このような抗体の製造は当業者既知の方法で行うことができる。 $\gamma$ -BNPはプロテアー

ぜによる切断可能な部位として、該配列番号 1 の第 47 位の Arg、53 位の Lys および 72 位の Arg を含有すると理論上考えられる。よって、配列番号 1 のアミノ酸番号 73-102 を認識する抗体を第 2 の抗体として用いることもできる。

本発明の測定法は競合法またはサンドイッチ法のいずれでもよく、用いる抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれでもよい。

第 1 の抗体および第 2 の抗体のうち、少なくとも一方は検出可能に標識されているか、または固相化されていてもよい。

抗体の標識および固相化法は当業者に既知である。標識としては、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質または粒子等を用いることができるが、これらに限定されない。抗体の標識法も既知であり、例えば河野ら（核医学技術、13(1), 2, (1993)）の方法により標識することができる。

本発明はまた、哺乳類の  $\alpha$ -BNP に反応する第 1 の抗体とプレプロ BNP もしくは  $\gamma$ -BNP 誘導体に反応するが  $\alpha$ -BNP には反応しない第 2 の抗体とを含むことを特徴とする、哺乳類の  $\gamma$ -BNP 誘導体に特異的な免疫測定のためのキットを提供する。

本発明のキットは競合法またはサンドイッチ法のいずれでもよく、用いる抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれでもよい。

第 1 の抗体および第 2 の抗体のうち、少なくとも一方は検出可能に標識されていてよく、また固相化されていてよい。さらに、本発明キットは標識を検出する手段を含んでいてもよい。該標識としては、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質または粒子を用いることができるが、これらに限定されない。

以下に実施例および試験例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

## 実施例 1

### サンドイッチ IRMA 法による $\gamma$ -BNP 誘導体の測定

以下の実施例において、一般の試薬は和光純薬社またはナカライテスク社の特級試薬を使用した。牛血清アルブミン (BSA) はシグマ社製を使用した。

(1) 血漿検体の調製

1) 心疾患患者もしくは健常人ボランティアから牛肺由来アプロチニン（シグマ社製）（500 KIU/L）添加EDTA採血管に静脈血を採取し、4℃、  
×2000 gで5分間遠心分離（コクサン社製H-107 RGA）し、血球分  
5 離を行った。得られた血漿検体は使用するまで-80℃で凍結保存した。

2) 上記1) で調製した心疾患患者および健常人由来の血漿をゲルろ過HPLCシステムLC10A（島津製作所社製）にSuperdex 75 10/30カラム（ファルマシア社）を用いて分画した。0.1 Mりん酸緩衝液（pH 7.5、0.3 M NaCl、5 mM EDTA）を用い、流速1 ml/minでカラムを平衡化した後、血漿検体1 mlを注入し、カラムからの溶出液1 mlづつを捕集する。各  
10 分画を用い、下記(2) - 2) のα-BNPの測定法および(2) - 3) のγ-BNP測定法に従い、それぞれ測定を行った。

(2) α-BNP測定系およびγ-BNP誘導体測定系の構築

1) 測定には、以下のペプチド、抗体およびキットを用いた。

15 ・ヒトα-BNP（ペプチド研究所社製）

・γ-hBNPアミノ末端部分（配列番号1におけるアミノ酸番号27-64）  
に対する抗体（ペプチド研究所社製）

・α-BNPカルボキシ末端部分に対するモノクローナル抗体（BC203）。

BC203はシオノリアBNPキット（塩野義製薬社製）に添付されているα-BNPのカルボキシ末端（129-134）に対するモノクローナル抗体であり、ビーズに固定化されており、固定化抗体として用いる。

・α-BNPリング構造部分に対するモノクローナル抗体（KY-BNPII）。

KY-BNPIIはシオノリアBNPキット（塩野義製薬社製）に添付されているα-BNPのリング構造（112-128）に対するモノクローナル抗体であり、<sup>125</sup>Iで標識されている。  
25

2) α-BNP測定系による血漿画分の測定

α-BNP測定には市販の「シオノリアBNPキット」（塩野義製薬社製）を用いた。この系では、α-BNPのリング構造に対するモノクローナル抗体（K

Y-BNP I I) およびカルボキシ末端に対するモノクローナル抗体 (BC 2 0 3) を用い、供給者の指示に従い、サンドイッチ I RMA (ImmunoRadioMetric Assay) 法で測定する。

すなわち、各測定検体および各種標準物質 ( $\alpha$ -BNP 溶液; 0、4、10、150、600、2000 pg/ml) をポリスチレン製の試験管に100  $\mu$  l 分注し、200  $\mu$  l のヨウ化BNP抗体 ( $^{125}$ I) 溶液を添加し、BC 2 0 3 抗体固相化ポリスチレンビーズを1個加えて攪拌後、4°Cで18時間静置して反応させた。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、放射活性を $\gamma$ カウンターARC-600 (アロカ社製) で測定した。その結果を図1および図2に示す。

### 3) $\gamma$ -BNP誘導体測定系による血漿画分の測定

まず、 $\gamma$ -hBNPアミノ末端部分 (27-64位) に対する抗体の $^{125}$ Iによる標識を行った。

$\gamma$ -hBNPアミノ末端部分 (配列番号1のアミノ酸番号27-64部分) に対する抗血清 (ペプチド社製) からMASP I Iキット (バイオラッド社製) を用いてIgGを精製し、セントリコン30 (アミコン社製) を用いて0.5Mりん酸緩衝液 (pH 7.5) に置換した。抗体標識はクロラミンT法を用いて行った。精製IgG溶液170  $\mu$  l (77.6  $\mu$ g IgG) をガラスチューブに分注し、Na $^{125}$ I溶液 (アマシャム社製) を10  $\mu$  l (34.2 MBq) 添加した。0.1%クロラミンT溶液20  $\mu$  lを添加し、室温で30秒間激しく攪拌した後、0.25%ピロ亜硫酸ナトリウム溶液および5%ヨウ化カリウム水溶液をそれぞれ20  $\mu$  lずつ加えて反応を停止した。Ampure SAカラム (アマシャム社製) により未反応の $^{125}$ Iの除去および脱塩を行い、 $^{125}$ I標識抗体を含む溶液を得た。

次いで、この抗体および $\alpha$ -BNPカルボキシ末端認識抗体 (BC 2 0 3) を固相したポリスチレンビーズを用い、血漿画分に対してサンドイッチ I RMA法で行った。

各測定検体100  $\mu$  lをポリスチレン製の試験管に分注し、200  $\mu$  lの0.1Mりん酸緩衝液 (pH 7.5、0.3M、5mMエチレンジアミン四酢酸 (ED

TA)、0.2%BSA、500KIU/1牛肺由来アプロチニン(シグマ社製)を添加し、BC203抗体固相ポリスチレンビーズを1個加えて攪拌後、4℃で18時間静置して反応させた。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、<sup>125</sup>I標識抗体溶液300μlを加えて攪拌し、4℃で18時間静置して反応させた。2mlの洗浄液で2回洗浄を行った後、放射活性をγカウンターARC-600(アロカ社製)で測定した。その結果を図3に示す。

### (3) 結果

患者血漿のゲルろ過HPLCによるクロマトグラムの測定結果を図1、図2および図3に示している。これらの図においてAはα-BNPの溶出位置である。

図1は、上記(2)-2)のα-BNP測定キットによる測定結果を示している。図中、縦軸は各分画中のシオノリアBNPで測定したBNP様物質の濃度、横軸はカラムからの溶出容量を表す。黒三角、白四角および白菱形はそれぞれ異なる血漿検体の測定結果を示している。

図2は、図1と異なる検体を用いて、上記(2)-2)のα-BNP測定系で測定した結果を示している。図中、縦軸は各分画中のシオノリアBNPで測定したBNP様物質の濃度、横軸はカラムからの溶出容量を表す。また、黒三角および黒四角は異なる血漿検体を示す。

図1および図2から、心疾患患者血漿中にはα-BNPよりも分子量の大きなBNP免疫活性様の物質が存在し、それがBNP免疫活性をもつ主要物質であることが分かる。

図3は、図2と同じ検体を用いて上記(2)-3)に記載の本発明のγ-BNP測定系による測定結果を示し、縦軸は本発明のγ-BNP免疫測定系で測定した放射活性を、横軸はカラムからの溶出容量を表している。また、黒丸はα-BNPを示す。図3中、黒丸はヒトα-BNP溶液を血漿の場合と同様にHPLCによって分画して測定された結果である。

図3から、本発明のγ-BNP誘導体特異的免疫測定法では、BNP免疫活性をもつ主要物質を検出することができるが、α-BNPは全く検出されないことが分かる。

以上の結果は、本発明の $\gamma$ -BNP免疫測定法が $\alpha$ -BNPを認識せず、 $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な測定方法であることを示している。また、BNP免疫活性をもつ主要物質が $\gamma$ -BNPであることも明らかとなった。

## 5 試験例 1

$\gamma$ -BNP誘導体および $\alpha$ -BNPの血漿中での安定性

上記実施例 1 における心疾患患者由来の血漿検体のゲルろ過HPLCの結果から、 $\gamma$ -BNP誘導体を含むと思われる分画を採取した。牛肺由来アプロチニン未添加のEDTA採血管を用い、健常人ボランティアから静脈血を採取し、上記

10 (1) - 1) と同様の操作により血漿検体 ( $\alpha$ -BNP最小検出限界 (4 pg/ml) 未満) を得、それに上記分画を添加後、室温 (25℃) にて0、2、6、24時間放置し、BNP免疫活性を、 $\alpha$ -BNPを測定するためのシオノリアBNPキットで測定し、 $\gamma$ -BNP誘導体の安定性を調べた。

15 一方、上記と同様の牛肺由来のアプロチニンを含まない健常人ボランティア血漿に化学的に合成した $\alpha$ -BNPを添加後、4℃で0、2、6、24時間放置し、そのBNP免疫活性を同様にシオノリアBNPキットで測定し、 $\alpha$ -BNPの安定性を調べた。

$\gamma$ -BNP誘導体および $\alpha$ -BNPの血漿検体中での免疫活性の安定性の結果を図 4 および図 5 にそれぞれ示す。

20 図 4 から、 $\gamma$ -BNP誘導体は25℃で24時間放置しても初期値の免疫活性に比較して有意な低下が見られないのに対し、図 5 から、 $\alpha$ -BNPは4℃で24時間放置した場合、初期値の約40%にまで免疫活性が低下することが分かる。

以上から、 $\alpha$ -BNPは $\gamma$ -BNP誘導体よりも血液中で著しく不安定であり、心疾患の診断には、後者が適することが示された。

25

## 産業上の利用の可能性

上記のように心不全症例でのBNP値は健常者の数十倍～数百倍に増加することもあり、心不全におけるBNPの変動は他のホルモンに類を見ないほど顕著で



あることから、BNP測定の有用性が示唆されている。

本発明の免疫測定法は、 $\alpha$ -BNPは測定せずに $\gamma$ -BNP誘導体の特異的に測定できる方法である。よって本発明測定法によれば、従来のBNP測定により判断されていた心不全診断およびモニタリング予後の判定とは異なる臨床上の意義を提供できると考えられる。

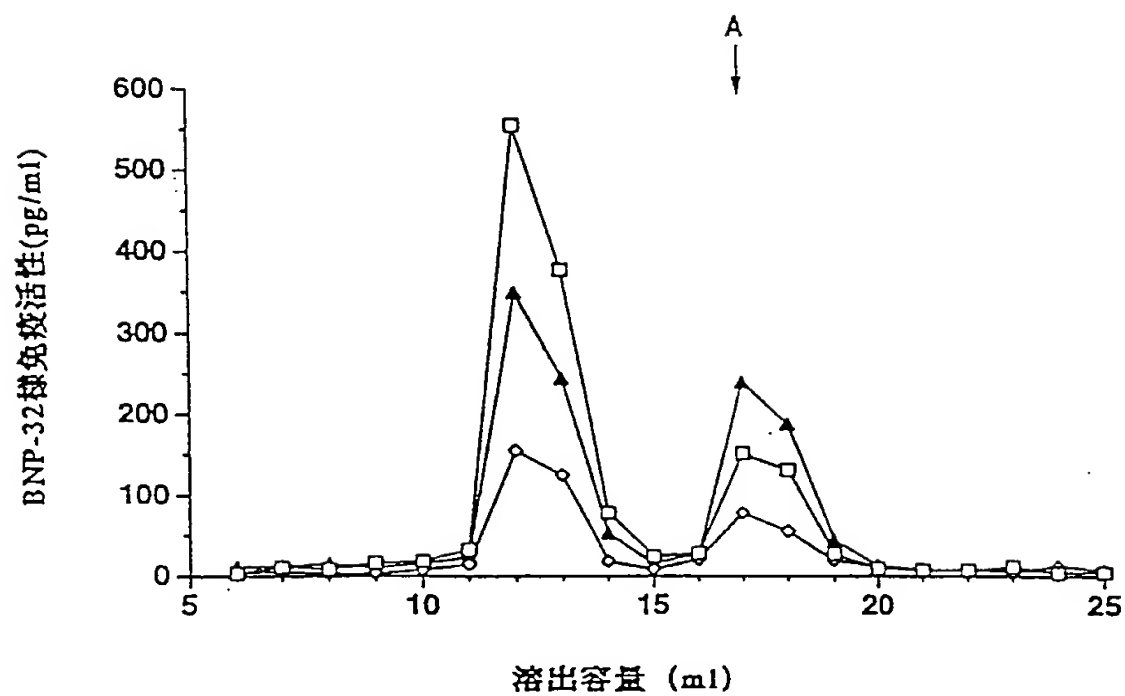
また、本発明測定法の測定対象である $\gamma$ -BNPは本明細書にて初めて明らかにされたように血中にて安定である。よって本発明測定法は測定検体の採取法、保存法および測定までの時間による影響を受けることなく安定な信頼性ある臨床データを提供でき、しかも採血試料に特別な処理を施す必要がないので、簡便に臨床データが得られ、心疾患のさらなる正確な診断に貢献し得る。

## 請 求 の 範 囲

1. 哺乳類の $\alpha$ -BNPに反応する第1の抗体とプレプロBNPもしくは $\gamma$ -BNP誘導体に反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない第2の抗体とを用いることを特徴とする哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な免疫測定方法。  
5
2.  $\gamma$ -BNP誘導体が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号27-102で示されるアミノ酸配列を包含するものである請求項1記載の方法。
3. 第2の抗体が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号27-102で示されるアミノ酸配列に特異的な抗体である請求項1記載の方法。  
10
4. 第1の抗体および第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されているか、あるいは固相化されていることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. 検出可能な標識が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質または粒子である請求項1～3のいずれかに記載の方法。  
15
6. 哺乳類の $\alpha$ -BNPに反応する第1の抗体とプレプロBNPもしくは $\gamma$ -BNP誘導体に反応するが $\alpha$ -BNPには反応しない第2の抗体とを含むことを特徴とする、哺乳類の $\gamma$ -BNP誘導体に特異的な免疫測定のためのキット。
7. 第1の抗体および第2の抗体のうち、少なくとも一方が検出可能に標識されているか、固相化されていることを特徴とする請求項6記載のキット。  
20
8. 標識を検出する手段をさらに含むことを特徴とする請求項7記載のキット。

1/5

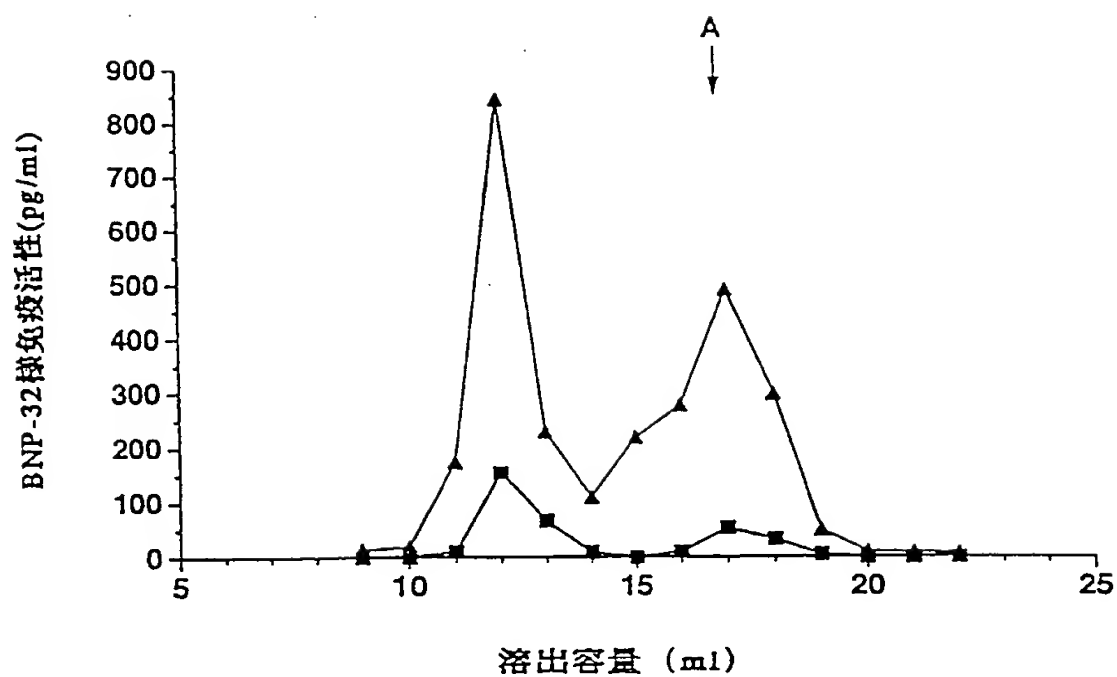
図 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/5

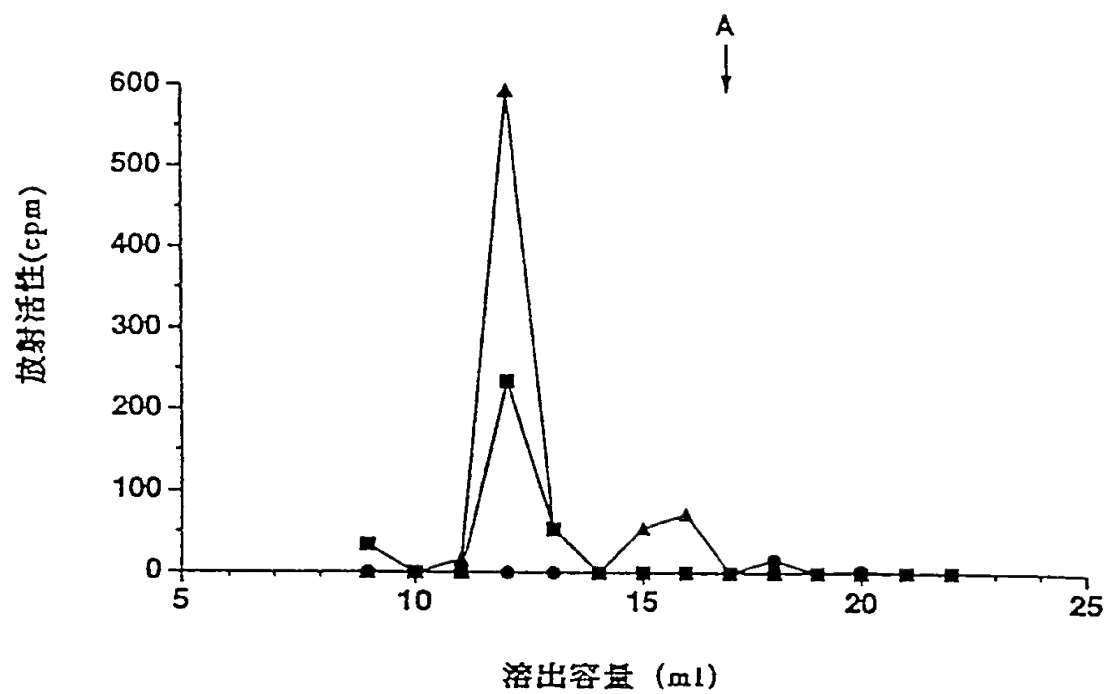
図2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/5

図3

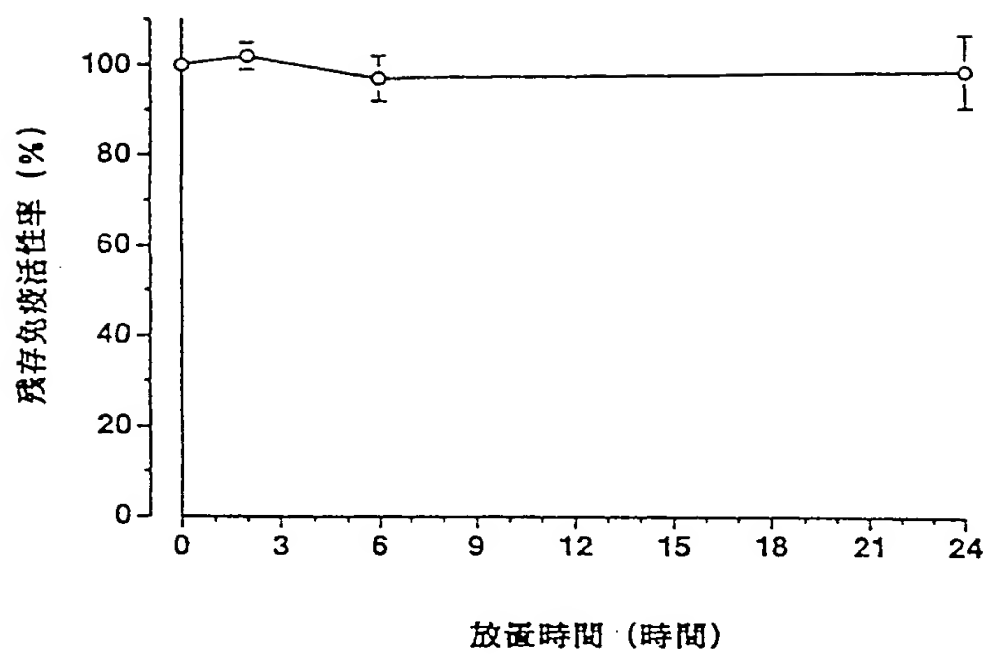


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4/5

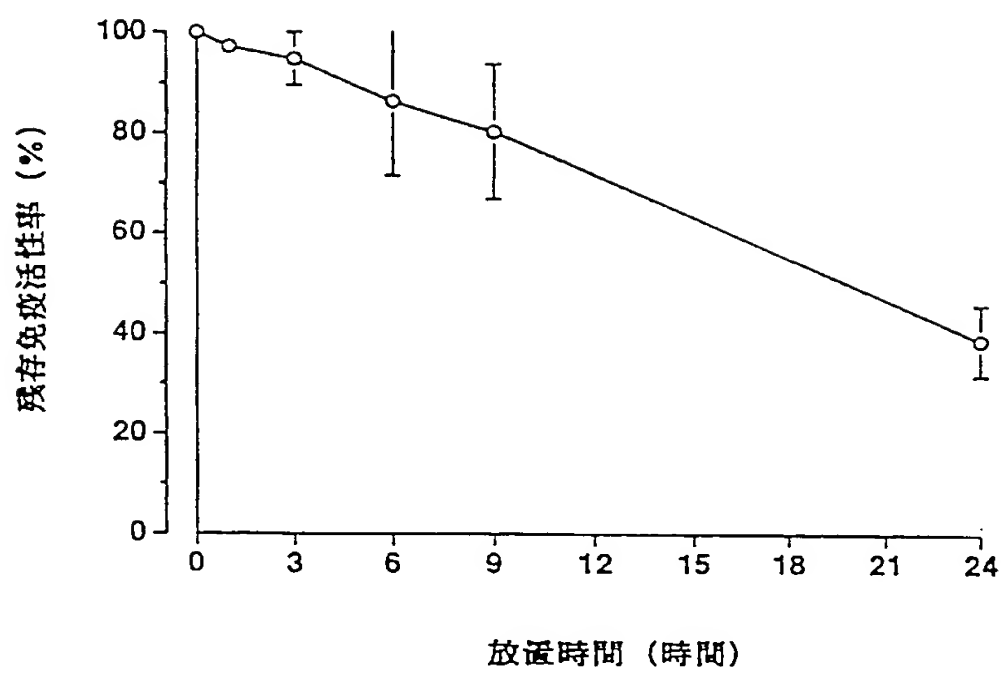
図4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/5

図5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/3

配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Shionogi &amp; Co., Ltd.

&lt;120&gt; Immunoassay for BNP

5 &lt;130&gt; 660984

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 246684/1997

&lt;151&gt; 1997-9-11

10 &lt;160&gt; 2

&lt;117&gt; Word (MS-DOS text)

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 436

&lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 1

atg gat ccc cag aca gca cct tcc cgc gcg ctc ctg ctc ctg ctc ttc 48

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe

1 5 10 15

20 ttg cat ctg gct ttc ctg gga ggt cgt tcc cac ccg ctg ggc agc ccc 96

Leu His Leu Ala Phe Lue Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro

20 25 30

ggg tca gcc tcg gac ttg gaa acg tcc ggg tta cag gag cag cgc aac 144

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn

25 35 40 45

cat ttg cag ggc aaa ctg tcg gag ctg cag gtg gac cag aca tcc ctg 196

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu

50 55 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/3

gag ccc ctc cag gag agc ccc cgt ccc aca ggt gtc tgg aag tcc cgg 244  
 Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
 65 70 75 80  
 gag gta gcc acc gag ggc atc cgt ggg cac cgc aaa atg gtc ctc tac 292  
 5 Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Try  
 85 90 95  
 acc ctg cgg gca cca cga agc ccc aag atg gtg caa ggg tct ggc tgc 340  
 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
 100 105 110  
 10 ttt ggg agg aag atg gac cgg atc agc tcc tcc agt gcc ctg ggc tgc 388  
 Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys  
 115 120 125  
 aaa gtg ctg agg cgg cat 436  
 Lys Val Leu Arg Arg His  
 15 130 134  
 <210> 2  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> human  
 20 <400> 2  
 Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Ala Phe Lue Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro  
 20 25 30  
 25 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn  
 35 40 45  
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
 50 55 60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



3/3

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
65 70 75 80  
Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Try  
85 90 95  
5 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
100 105 110  
Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys  
115 120 125  
Lys Val Leu Arg Arg His  
10 130 134

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1998年  
 日本国公開実用新案公報 1971-1995年  
 日本国登録実用新案公報 1994-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, REGISTRY

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P、7-507210、A (メディノール エスエフ) 10. 8 月. 1995 (10. 08. 95) & WO93/24531、A	1-8
Y	J P、3-297392、A (塩野義製薬株式会社) 27. 12 月. 1991 (27. 12. 91) (ファミリーなし)	1-8
Y	FEBS LETTERS, 第400巻第2号 (1997) P177-18 2、特にP178 2. 2	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 12. 98

国際調査報告の発送日

15.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美一恵

2 J 9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N33/53Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1998 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1995Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA, REGISTRY

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-507210, A (Medinnova SF), 10 August, 1995 (10. 08. 95) & WO, 93/24531, A	1-8
Y	JP, 3-297392, A (Shionogi & Co., Ltd.), 27 December, 1991 (27. 12. 91) (Family: none)	1-8
Y	FEBS LETTERS, Vol. 400, No. 2 (1997) P177-182, particularly P178 2.2	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
4 December, 1998 (04. 12. 98)Date of mailing of the international search report  
15 December, 1998 (15. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**